Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Basel

Studien der Erythrocytenoberfläche

Teildruck der

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Mariann Scherrer-Gervai

aus Egnach (Thurgau)

Basel, 1962

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren *T. Reichstein* und *J. Tomcsik*.

Basel, den 26. Juni 1962. *M. Eichler*, Dekan.

Frau *Mariann Scherrer-Gervai* wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 26. Juni 1962 erlaubt, diesen Teildruck ihrer am 26. Juni 1962 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel: Studien der Erythrocytenoberfläche kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Institut für Organische Chemie der Universität Basel;
2. im Hygiene-Institut der Universität Basel;
3. in der Universitätsbibliothek Basel;
4. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Separatabdruck aus «Pathologia et Microbiologia», Band 24, Heft 5, Jahr 1961

Morton und Pickles (2) zeigten, daß die gewaschenen Erythrocyten mit hohen Verdünnungen von proteolytischen Enzymen, während kurzer Zeit, bei 37° C, partiell verdaut werden können, ohne daß sie Haemolyse aufweisen; doch verhielten sich die derartig vorbehandelten Erythrocyten bei der Haemagglutination mit gewissen Antikörpern wesentlich anders als die Erythrocyten, die mit proteolytischen Enzymen nicht vorbehandelt wurden. Die mit Trypsin oder mit Papain vorbehandelten Erythrocyten werden in allen «Rhesus-Laboratorien» der Welt zur Haemagglutination verwendet, wodurch, der herrschenden Ansicht nach, «inkomplette» Antikörper nachgewiesen werden können. *Coombs* (1) war in seinem, in unserer Gesellschaft gehaltenen Referat der Meinung, daß «the rationale (dieser veränderten Reaktion) is not fully understood». *Tomcsik* entwickelte die Hypothese (4), daß die veränderte serologische Reaktion der proteolytisch vorbehandelten Erythrocyten auf die enzymatische Verdauung einer lockeren Proteinschicht zurückzuführen ist, die gewisse, aus der semipermeablen Membran emporragende Antigenmizellen deckt und dadurch die Antikörper-Brückenbildung bei der Haemagglutination sterisch hemmt. Die sterische Hemmung wird durch die vorsichtige enzymatische Entfernung der auf die Oberfläche der Erythrocyten gelagerten lockeren Proteinschicht aufgehoben. Eine außergewöhnlich mächtige Proteinschicht soll alle Antigenmizellen an der Oberfläche der Rindererythrocyten bedecken (4), da sie jedweder Haemagglutination praktisch unzugängig sind.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der mit proteolytischen Enzymen vorbehandelten und doch nicht haemolysierten Erythrocyten wurden kaum untersucht. Nach *Ponder* (3) sollen die derartig vorbehandelten Erythrocyten starrere Membranen aufweisen. Wir haben vor zwei Jahren mit einer umfangreichen Serie von experimentellen Arbeiten angefangen, in der wir vor-

* Arbeit, unterstützt vom BIGA (Bundesamt für Arbeit usw., Bern).

wiegend die aus trypsinisierten und nicht-trypsinisierten Erythrocyten hergestellten Membranen mit einer Anzahl von physikalischen und chemischen Methoden untersuchten. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über unsere erste Beobachtung, wonach bereits durch Suspension der zweierlei Membranen in verschiedenen Neutralsalzen beträchtliche Unterschiede veranschaulicht werden können.

Herstellung der Erythrocytenmembranen

Die Membranen wurden vorwiegend aus Rindererythrocyten, aber auch aus Schaf- und Menschenerythrocyten gewonnen. Die Gerinnung des frischgewonnenen Blutes wurde — von einigen Ausnahmen abgesehen, wo Citrat verwendet wurde — durch ausgiebiges Schütteln mittels Glasperlen verhindert. Die Erythrocyten wurden durch vielmaliges Waschen des Blutes von den Serumproteinen befreit.

Zur Trypsinbehandlung der Erythrocyten wurden einem Volumen des zentrifugierten Blutkörperchensedimentes 19 Volumen kristallisiertes, 1 : 50 000 in Pufferlösung pH 8 verdünntes Trypsin Mann oder nichtkristallisiertes, 1 : 10 000 verdünntes Trypsin Siegfried (Zofingen) gegeben und im Wasserbad während 30 Min. bei 37° C gehalten. Nachher wurden die behandelten, aber nicht haemolysierten Erythrocyten vom überschüssigen Trypsin durch zweimaliges Zentrifugieren befreit.

Zur Haemolyse wurden in einigen Versuchen einem Volumen des abzentrifugierten Sedimentes der trypsinisierten und nichttrypsinisierten Erythrocyten je 20fache Volumenmengen von dest. Wasser ohne Ansäuerung zugegeben. In den meisten Versuchen wurden nur 10fache Volumenmengen von dest. Wasser zugegeben und das pH durch Einleitung von CO_2 oder durch Zugabe von HCl herabgesetzt.

Die durch Änderung der Einleitungszeit von CO_2 erhaltenen, elektrometrisch festgestellten pH-Werte variierten zwischen 5,9 und 6,85, diejenigen nach HCl-Zugabe zwischen 5,0 und 6,5.

Die bei einer unterhalb pH 6,5 durchgeführten Haemolyse gewonnenen Membranen konnten in einer MSE-Kühlzentrifuge (W. Edwards & Co., London) im Winkelkopf mit 5000 Umdrehungen (pro Min.) während 10 Min. gut abzentrifugiert und gewaschen werden; sie zeigten in 16 Std. auch ohne Zentrifugieren, im Eisschrank, eine Tendenz zu spontaner Sedimentation. Die bei höherem pH gewonnenen Membranen bildeten eine stabilere Suspension; sie wurden bei 5000 Umdrehungen in 30 Min., in der Sharples Superzentrifuge jedoch bei 30 000 Umdrehungen in wenigen Min. fast restlos abzentrifugiert.

Die aus trypsinisierten und aus nichttrypsinisierten Erythrocyten mit dem gleichen Verfahren hergestellten Membranen ver-

rieten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Suspensionsstabilität.

Die Membranen wurden in der Regel zweimal gewaschen, doch zeigten sie in ihrer abzentrifugierten Masse eine rosa Farbe. Die Spuren von Haemoglobin — die auch serologisch nachgewiesen wurden — waren an die strukturellen Elemente der Membranen anscheinend derartig fix gebunden, daß sie mit mehrmaligem Waschen in der Zentrifuge nicht entfernt werden konnten. Eine kurze Ultraschallbehandlung entfernte zwar das Haemoglobin, sie hat aber die Struktur der Membranen beträchtlich beschädigt.

Die aus nativen Erythrocyten gewonnenen Membranen behielten, ohne Eintrocknung in dest. Wasser suspendiert und im Phasenkontrastmikroskop (Wild & Co., Objektiv 85) in feuchten Präparaten untersucht, ihre ursprüngliche Form. Sie sind scheiben-, selten schüsselförmige (Abb. 1 Pfeil), durchsichtige Gebilde, deren Rand mehr oder weniger deutlich sichtbar ist.

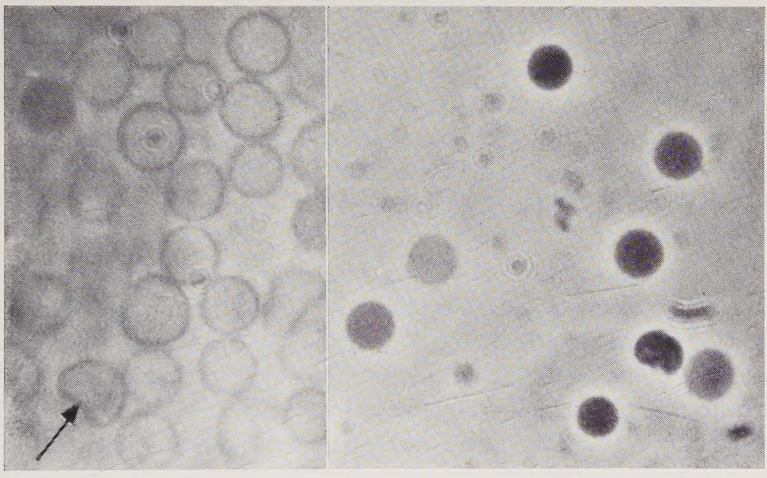


Abb. 1 *Abb. 2*

Abb. 1 und 2. Effekt von 0,2% NaCl, 1. auf nichttrypsinisierte Membranen, 2. auf trypsinisierte Membranen.

Selten treten in der Suspension der aus nativen Erythrocyten gewonnenen Membranen im dest. Wasser hell- oder dunkelgraue (Abb. 1) Scheiben oder Kugeln auf. Diese Formen kommen weitaus häufiger vor in einer ähnlichen Suspension der Membranen, die aus trypsinisierten Erythrocyten hergestellt wurden. Die trypsinisierten Membranen sind im Phasenkontrastmikroskop sofort

zu erkennen, da selbst diejenigen, die durchsichtig sind, einen geringeren Durchmesser aufweisen und mehrheitlich kugelförmig sind.

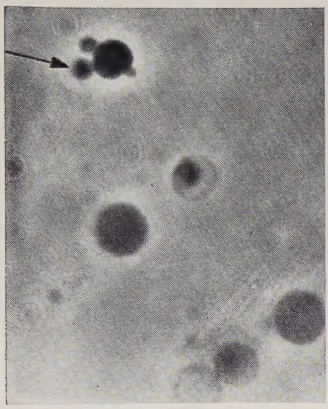
Salzeffekt

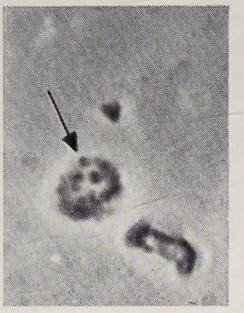
Wenn die Löslichkeit der Salze es erlaubte, bereiteten wir eine 16%ige (Gew./Vol.) Grundlösung, die in Zweier-Potenzen bis 0,12% verdünnt wurde. Je 0,2 ml dieser Reihe wurde mit je 0,2 ml einer ziemlich dichten Membransuspension vermengt. Die Dichte der Membransuspension wurde so gewählt, daß, wenn 1 bis 2 Ösen des Gemisches auf einen Objektträger deponiert und mit Deckglas (ohne Druck) abgedeckt wurden, etwa 50 Formelemente pro Gesichtsfeld des Phasenkontrastmikroskops (Objektiv 85) fielen. Die mikroskopischen Befunde zeigten keine wesentlichen Unterschiede, wenn die Untersuchung innerhalb weniger Minuten oder aber nach einigen Stunden (feuchte Kammer zur Aufbewahrung der mikroskopischen Präparate) vorgenommen wurde.

In der Suspension der trypsinisierten Membranen traten bereits bei 0,1—0,2% NaCl- und KCl-Konzentration hellgraue, dunkelgraue, später schwarze Kugeln auf (Abb. 2).

In diesem Konzentrationsbereich der Salze kam keinerlei sichtbare Veränderung zustande, wenn die Membranen aus nativen Erythrocyten gewonnen wurden. In den letzterwähnten Membranen konnte eine Änderung (sphärische Transformation), die derjenigen der trypsinisierten Membranen ähnlich, aber weniger fortgeschritten war, erst dann beobachtet werden, wenn die Konzentration von NaCl oder KCl in der Membransuspension 4 bis 8% betrug.

Eine unerwartete Beobachtung haben wir bei 0,5 bis 1% Salzkonzentration an trypsinisierten Erythrocyten gemacht. Die Zahl der Formelemente pro Gesichtsfeld des Phasenkontrastmikroskops wuchs auf das Mehrfache. Kleine, in höherer Salzkonzentration winzige, absolut regelmäßige Kügelchen erschienen. Bei weiterer Steigerung der Salzkonzentration war das Gesichtsfeld mit Tausenden von tanzenden Körnchen gefüllt. Nur die trypsinisierten Membranen zeigten bei höherer Salzkonzentration einen granulären Zerfall. Je kleiner die schwarzen, regelmäßigen Kügelchen oder die Granula wurden, desto lebhafter war ihre Brownsche Molekularbewegung geworden. Leider konnten wir die technischen Schwierigkeiten beim Photographieren nicht überwinden, deshalb mußten wir aus unseren anderen Arbeiten Mikrophotographien zuziehen (Abb. 3, 4 und 5), um die Bildung der Kügelchen bzw. der Granula nicht nur in einem Schema, sondern auch an Hand von Mikrophotographien veranschaulichen zu können.





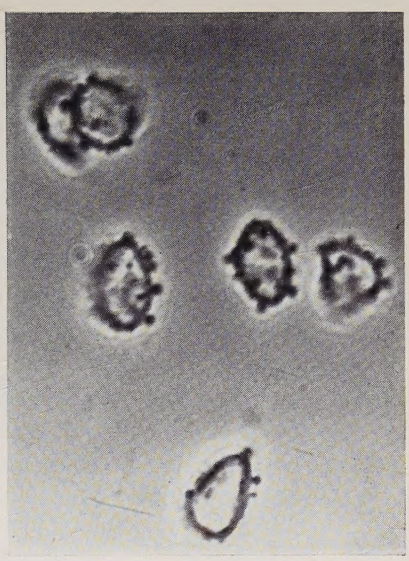


Abb. 3 *Abb. 4* *Abb. 5*

Abb. 3. Bildung der Filialkügelchen an der Oberfläche einer mittelgroßen kleinen Kugel.

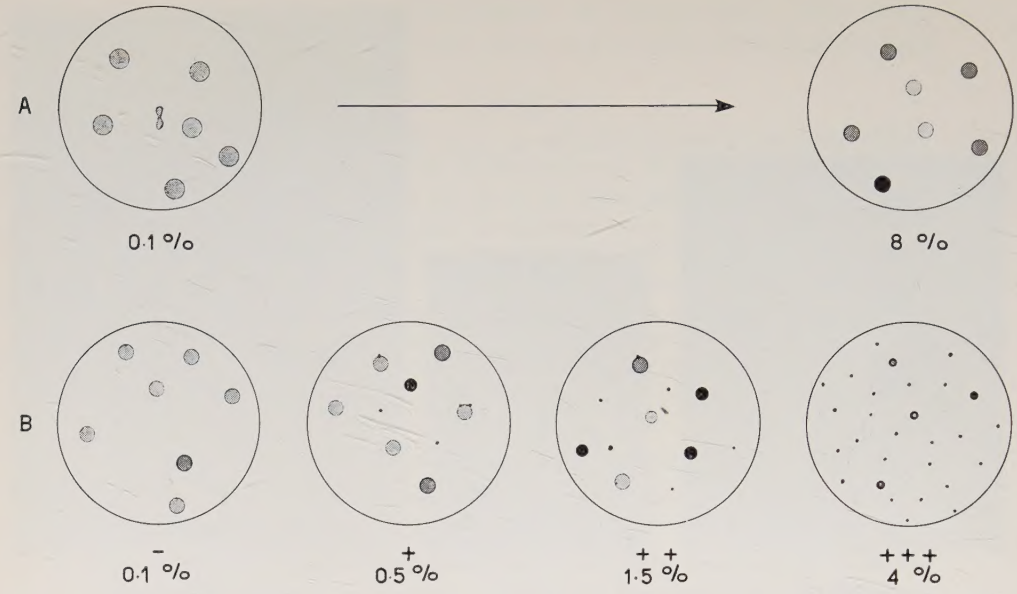
Abb. 4. Bildung von Kügelchen und Granula im Inneren einer durchsichtigen Membran.

Abb. 5. Vielfache «Knospenbildung» an der Oberfläche der trypsinisierten Membranen.

Wenn die geprüften Salze nicht enger als in Zweier-Potenzen verdünnt wurden, kam der Zerfall der trypsinisierten Membranen derartig sprunghaft zustande, daß Zwischenstufen nicht beobachtet werden konnten. Bei anderen Membran-Präparaten konnte die Evolution dieses Phänomens stufenweise beobachtet werden: deshalb fassen wir die einzelnen Stufen in der folgenden schematischen Abbildung zusammen.

Schematische Abbildung s. S. 350

In der $+++$ Reaktion der Abbildung wurden 4 winzige Kügelchen und zahlreiche Granula dargestellt. In einer $++++$ Reaktion sind im Phasenkontrastmikroskop ausschließlich Granula zu sehen. Wenn die Zahl der Membranen vor der Salzbehandlung pro Gesichtsfeld zk. 50 betrug, konnten in diesem Stadium pro Gesichtsfeld tausende von Granula beobachtet werden.



Schematische Abb. Wirkung verschiedener Konzentrationen von NaCl und KCl auf Rindererythrocyten-Membranen, die aus A. nativen, B. trypsinisierten Rindererythrocyten hergestellt worden sind.

Die im Schema erklärten Zeichen wurden bei der Zusammenstellung der Tabelle I verwendet, in der einige typische Salzeffekte registriert wurden.

TABELLE I

Effekt der Neutralsalze auf Rindererythrocyten-Membranen

Nr.	Trypsin Behandl. d. Erythr.	Salz	% Gew./Vol. der Salze							
			0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
1	–	NaCl	–	–	–	–	–	–	–	±
2	–	KCl	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	KNO_3	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	K_2SO_4	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	Na_3PO_4	–	–	–	–	U	U	U	U
6	+	NaCl	–	–	–	+	++	+++	++++	++++
7	+	KCl	–	–	–	+	++	+++	++++	++++
8	+	KNO_3	–	–	+	++	+++	+++	++++	++++
9	+	K_2SO_4	–	–	+	++	+++	+++	++++	++++
10	+	Na_3PO_4	–	–	–	+	U	U	U	U

Zeichenerklärung: –, +, ++, +++ = siehe schematische Abb. ++++ = unzählige kleine Körnchen, ohne kleine schwarze Kugeln. U = fast unsichtbare Schatten.

NaCl-Versuche wurden, an je 13 trypsinisierten und nichttrypsinierten Rindererythrocyten-Membranen, insgesamt in 56 Versuchsreihen vergleichend durchgeführt. Die Tabelle I zeigt den durchschnittlichen Verlauf der NaCl-Versuche. Bei zwei trypsinisierten Membranpräparaten wurde größere Resistenz und bei einem einzigen nativen Membranpräparat eine gewisse Empfindlichkeit bei höheren NaCl-Konzentrationen beobachtet. Der Unterschied zwischen trypsinisierten und nichttrypsinisierten Membranen war aber auch in diesen Ausnahmefällen deutlich. Im allgemeinen war die Empfindlichkeit der trypsinisierten Membranen höher, wenn das pH bei der Haemolyse 6,2 bis 7 betrug und wenn die Membranen in hochtouriger Zentrifuge (Sharples) gewaschen wurden. Die aus nativen Erythrocyten hergestellten Membranen blieben in der Regel auch bei einer solchen Behandlung resistent. Das Verhalten der aus Schaf- bzw. aus Mensch-Erythrocyten bereiteten Membranen war ähnlich.

KCl-Versuche wurden an 4 Membranpräparaten in 22 Versuchsreihen angestellt. Die Resultate waren ähnlich wie bei NaCl. Ein resistentes Membranpräparat wurde parallel in NaCl-, KCl- und in Na_3PO_4-Versuchen untersucht. Die Resistenz dieses Membranpräparates manifestierte sich gleicherweise gegenüber NaCl und KCl; gegenüber Na_3PO_4 war es aber empfindlich wie die anderen Membranen. Wir beabsichtigen, in einer späteren, nachfolgenden Arbeit über den pH-Effekt auf die zweierlei Membranpräparate zu berichten.

Die Zahl unserer Untersuchungen mit KNO_3 und mit K_2SO_4 halten wir für ungenügend, um eine größere Empfindlichkeit der trypsinierten Membranen gegenüber diesen Salzen mit Sicherheit annehmen zu können, wie in der Tabelle angeführt wurde. KJ wirkte ähnlich. $BaCl_2$ (bis 4%), $KMnO_4$ (bis 2%), Borax (bis 2%) haben keinen Zerfall der Membranen hervorgerufen. $HgCl_2$ und $CuSO_4$ fällten beide Membranen aus ihrer homogenen Suspension aus.

Der Effekt von Na_3PO_4 (leicht alkalisches Salz) war von ganz anderer Natur. Bei Erhöhung der Konzentration dieses Salzes auf 1% ist die Sichtbarkeit von beiden Membranen im Phasenkontrastmikroskop sehr schlecht geworden. Bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration schienen die Gesichtsfelder des Mikroskopes leer zu sein; nur hie und da konnten vereinzelte, kaum sichtbare Membranschatten entdeckt werden. Eine scheinbare Auflösung er-

folgte in den Na_3PO_4-Versuchen sowohl bei den trypsinisierten wie bei den nativen Membranen ohne Unterschied. Na_2CO_3 wirkte gewissermaßen ähnlich; bei Natriumacetat konnte hingegen bis zu 10% kein Effekt beobachtet werden.

Diskussion

Wir kennen keine frühere experimentelle Arbeit, in der das Verhalten der Erythrocytenmembranen in verschiedenen Konzentrationen der neutralen bzw. leicht alkalischen Salze untersucht worden wäre. Unsere diesbezügliche Arbeit betrachten wir in gewisser Hinsicht als lückenhaft. Wir könnten aus unseren Beobachtungen kein gesetzmäßiges Verhalten gegenüber den verschiedenen Kationen und Anionen ableiten. Eins ist aber sicher, daß diejenigen Erythrocytenmembranen, die aus Erythrocyten nach einer schonenden Behandlung mit proteolytischen Enzymen gewonnen wurden, in einer verhältnismäßig niedrigen Konzentration von gewissen Neutralsalzen suspendiert, in eigenartiger Weise zerfallen. Dieses Phänomen mag einen Beitrag dazu liefern, in welcher Weise die Oberfläche der Erythrocyten beeinflußt wird, wenn diese nach *Morton und Pickles* (2) zu gewissen serologischen Untersuchungen vorbehandelt werden.

Ein überraschendes Phänomen, welches im Laufe dieser Arbeit beobachtet werden konnte, ist, daß der granuläre Zerfall der trypsinisierten Erythrocyten durch die Abschnürung absolut regelmäßiger globoider Gebilde aus den Erythrocytenmembranen eingeleitet wird. Die sphärische Umwandlung des Bakteriencytoplasmas wurde von uns unter gewissen enzymatischen Einflüssen beschrieben (5 und 6). Zum erstenmal wird aber in dieser Arbeit berichtet, daß globoide Elemente auch aus Membranen entstehen können. Es scheint ein allgemeines biologisches Gesetz zu sein, daß hochmolekulare Substanzen der Zellen eine sphärische Gestalt infolge Einwirkung der Oberflächenspannung annehmen, wenn sie:

1. genügend klein,
2. größtenteils halbflüssig,
3. nicht von starren Membranen begrenzt,
4. in der Suspensionsflüssigkeit nicht leicht löslich sind.

Summary

Membranes, prepared from trypsin-treated beef-erythrocytes showed a peculiar fragility, when suspended in low concentrations of certain neutral salts. A phaenomenon is described consisting of a globoid transformation of the membranes of trypsinized erythrocytes.

Literatur

1. *Coombs, R. R. A.:* Methods for the detection of incomplete antibodies and their diagnostic importance. Schweiz. Z. Path. Bakt. *17:* 424-439 (1954).
2. *Morton, J. A.* and *Pickles, M. M.:* Use of trypsin in the detection of incomplete anti-Rh antibodies. Nature *159:* 779-780 (1947).
3. *Ponder, E.:* Effects produced by trypsin on certain properties of the human red cell. Blood *6:* 350-356 (1951).
4. *Tomcsik, J.:* Neue Wege zur serologischen Diagnose der Mononucleosis infectiosa. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissensch. *16:* 185-205 (1960).
5. *Tomcsik, J.* et *Bouille, M.:* Effet cytologique des enzymes produits au cours de la sporulation des Bacilles aérobies. Ann. Inst. Pasteur (Paris) *100:* 25-36 (1961).
6. *Tomcsik, J.* und *Guex-Holzer, S.:* Änderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung. Schweiz. Z. Path. Bakt. *15:* 517-525 (1952).

Curriculum vitae

Mariann Rosa Scherrer-Gervai, Tochter des Josef Gervai, Agronom, und der Ella, geborene Fried, beide wohnhaft in Basel. Bürgerort: Egnach (TG), Schweiz, geboren am 11. September 1930 in Budapest, Ungarn.

Vorbildung und Studium: Primarschule in Zagreb, Jugoslawien 1937—1941, Gymnasium in Budapest 1941—1949, Maturitätszeugnis Budapest 1949, Technische Hochschule Budapest 1950—1954, Abschlußprüfung an derselben 1954, Diplomarbeit 1954—1955, Diplom als Ing. chem. der Technischen Hochschule Budapest 1955.

Berufliche Tätigkeit: Chinoin, Pharmazeutische Fabrik, Budapest (Streptomycinabteilung) 1955—1956, Ciba AG, Basel (Pharma-Forschungsabteilung) 1957—1959.

Dissertationsarbeit an der Phil.-Natw. Fakultät der Universität Basel. Leiter der Dissertation: Prof. Dr. *J. Tomcsik* (Hygiene-Institut).

Besuchte Vorlesungen der Herren Dozenten M. Brenner, H. Erlenmeyer, C. Grob, W. Kuhn, T. Reichstein, O. Schindler, Ch. Tamm, J. Tomcsik, R. Wizinger.

Nebenfachexamina: Physikalische Chemie (Prof. Dr. W. Kuhn), Bakteriologie-Hygiene (Prof. Dr. J. Tomcsik).